

五氯苯酚厌氧生物降解及降解体系 中细菌种群结构分析

张 黎¹ 谭贵良^{2,3} 堵国成² 陈 坚^{1,2} 刘 和^{1*}

(1. 江南大学环境与土木工程学院环境生物技术研究室 无锡 214122)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

(3. 广东省中山市质量计量监督检测所 中山 528403)

摘 要: 研究了不同外加碳源作为共代谢基质及氢气作为电子供体条件下 PCP 的厌氧生物降解特性, 并借助末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)分析了 PCP 降解菌群的微生物群落结构。结果表明, 添加外加碳源及以氢气作为电子供体均对 PCP 降解有显著促进作用。添加葡萄糖、丙酮酸、酵母膏和氢气时的降解率分别为 71%、56%、51%和 74%。微生物群落结构分析表明, 不同处理条件下 PCP 降解菌群微生物群落结构不同。PCP 降解菌群中可能存在 *Clostridium*、*Frankia* 和 *Desulfitobacterium* 等属的微生物。

关键词: 五氯苯酚, 厌氧降解, 共代谢, T-RFLP 技术

Characteristics of PCP Anaerobic Biodegradation and Analysis of Microbial Community Structure in Degrading Consortium

ZHANG Li¹ TAN Gui-Liang^{2,3} DU Guo-Cheng² CHEN Jian^{1,2} LIU He^{1*}

(1. Laboratory of Environmental Biotechnology, School of Environmental and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122)

(3. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403)

Abstract: Effect of carbon source (glucose, pyruvate, yeast extract) and electron donor (H_2) on anaerobic degradation of pentachlorophenol (PCP) was investigated. Differences of bacterial community in the anaerobic systems were also detected by terminal restriction fragment length polymorphism technique (T-RFLP). Compared with carbon-free system, the supplementation of different carbon sources and H_2 may greatly enhance the degradation of PCP. The analysis of T-RFLP showed that bacterial community structures were different under different treatment conditions. It was speculated that some microorganisms phylogenetically affiliated with the genus *Clostridium*, *Frankia* and *Desulfitobacterium* existed in the PCP-degrading systems.

Keywords: Pentachlorophenol, Anaerobic biodegradation, Cometabolism, T-RFLP

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30640018); 江苏省博士后科研资助计划项目(No. 0701005C)

* 通讯作者: Tel: 0510-85918310; ✉ liuhe@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2008-01-15; 接受日期: 2008-03-24

五氯苯酚(PCP)广泛应用于木材防腐剂、杀虫剂、杀菌剂等领域,是一种难降解的人工合成化合物,在环境中容易积累^[1]。为了减少 PCP 对环境的污染及对人体的危害,近年来国内外学者对其生物降解进行了广泛的研究。由于 PCP 在厌氧条件下较容易发生还原脱氯降解^[2],因此 PCP 的厌氧降解一直以来都是研究的热点。不过至今仅发现几个属微生物(如 *Desulfotobacterium*^[2,3]和 *Desulfomonile*^[4])能对 PCP 进行严格地厌氧脱氯降解。同时也发现在 PCP 的厌氧降解中,添加葡萄糖等外加碳源有利于 PCP 的降解^[5]。

但是由于传统培养的局限性,分离到的物种并不能真实反映厌氧降解 PCP 的微生物多样性信息,迫切需要采用新的分子生物学手段对其进行系统研究。近年来兴起的基于 16S rRNA 基因的免培养技术—末端限制性片段长度多态性技术(T-RFLP)是一种 RFLP 技术和荧光标记技术相结合后发展而来较先进的分子生态学方法^[6]。该技术能够提供微生物种群结构和数量动态变化的信息,可为人们分析和比较环境样品微生物群落结构提供新的手段。但目前仅有应用该技术对 PCP 降解生物群落多样性进行研究的少量报道^[7]。而对添加不同外加碳源和电子供体条件下 PCP 厌氧降解微生物群落结构的变化特性研究,国内外还鲜见报道。基于以上研究现状,本文研究了以不同外加碳源作为共代谢基质及氢气作为电子供体时 PCP 的厌氧生物降解特性;同时还利用 T-RFLP 技术分析了以上不同处理条件下 PCP 降解菌群的微生物群落结构变化,并对样品中可能存在的优势微生物进行了推测,旨在为全面认识 PCP 厌氧降解微生物的多样性及降解机理提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 种泥来源及驯化

种泥取自无锡格林艾普化工厂车间地沟的底泥。驯化方法如下:培养基为 RAMM 培养基^[8]。取 200 g 种泥加入到 500 mL 带有上下嘴的摇瓶。驯化过程中逐渐增加 PCP 的投入量,其终浓度由 5 mg/L 到 20 mg/L。每周更新一次培养基。更新培养基时充入氮气以保持摇瓶内为厌氧状态。摇瓶置于摇床中培养(35 ℃, 120 r/min)。每周更新培养基时测定摇瓶内 PCP 的浓度。2 个月后发现 PCP 的降解率在 50%

以上,证明此驯化培养物已具有降解 PCP 的能力。

1.2 PCP 降解实验

分别考察上述驯化培养物在 5 种处理情况下对 PCP(20 mg/L)的厌氧降解特性。处理 1:加入 2 g/L 葡萄糖(TOC 为 1250.6 mg/L)作为外加碳源;处理 2:加入 10 mmol/L 丙酮酸(TOC 为 741.8 mg/L)作为外加碳源;处理 3:加入 1 g/L 酵母膏(TOC 为 1352.0 mg/L)作为外加碳源;处理 4:不添加外加碳源(对照组);处理 5:充入氢气(氢气处理组,氢气:二氧化碳:氮气的体积比为 1:1:8)。除第 5 个处理外,其他 4 个处理中均充入氮气以保持厌氧环境。以上各处理组各设 3 个重复。每隔 1 d 测定 1 次 PCP 的浓度。同时还考察了不同葡萄糖浓度(1 g/L、2 g/L、5 g/L 和 10 g/L)对 PCP 降解的影响。

1.3 PCP 的测定

采用高效液相色谱法(Agilent 1100)。PCP 的测定条件为:C₁₈柱,柱温 30 ℃,流动相中甲醇占 90%,2%乙酸占 10%;检测波长为 220 nm,带宽 20 nm;流速 1 mL/min。

1.4 总 DNA 的提取及 PCR 扩增

总 DNA 提取参照 Tsai & Olson 的方法^[9],并做适当调整。具体方法如下:取以上 5 种处理的新鲜污泥样品 0.5 g,置于 1.5 mL 离心管中。加入 250 μL lysis buffer(0.1 mol/L NaCl-0.1 mol/L Na₂EDTA, pH 8.0)和新鲜配置的 50 μL lysozyme(终浓度为 15 mg/L),37 ℃水浴 2 h 后,加入 300 μL 0.1 mol/L NaCl-0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)-10% SDS,轻轻混匀,在液氮中进行 3 次反复冻融处理,之后依次加入等体积的 Tris-饱和酚、酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)对 DNA 进行抽提,DNA 用异丙醇沉淀。经 70%酒精淋洗和干燥后,用 30 μL TE (10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA; pH 8.0)溶解 DNA。PCR 扩增前,采用 Sepharose 4B (Sigma 公司)对 DNA 粗提物进行过柱纯化。采用细菌通用引物 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和 1492R (GGTACCTTGTTACGACTT)^[10]对总 DNA 进行 PCR 扩增。其中 27F 的 5'端用 FAM 标记(6-carboxyfluorescein, 上海基康生物工程有限公司)。扩增条件为:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,25 个循环;最后 72 ℃10 min,4 ℃保存。扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检查,Gold view 染色并在凝胶成像系统上拍照

观察。

1.5 T-RFLP 分析

PCR 纯化产物用 *Hae* 酶 (TaKaRa 公司) 进行酶切。酶切获得的 DNA 片段送上海基康生物公司进行检测。检测结果数据包含单种酶消化后的 T-RF 的片段大小和峰面积, 把这些信息上传至威斯康星-麦迪逊大学建立的基于 Web (<http://trflp.limnology.wisc.edu/assignment.jsp>) 的 T-RFLP 数据分析方法进行分析处理。碱基大小在 50 bp 以下以及相对丰度 (根据峰面积计算) <1% 的 T-RF 被排除在进一步的统计范围外。

2 结果与讨论

2.1 PCP 厌氧降解特性

经驯化的培养物在以葡萄糖、丙酮酸、酵母膏作为外加碳源处理下, PCP 降解趋势明显 (图 1)。PCP 的浓度由初始的 10 mg/L~16 mg/L 降到 8 mg/L 以下, 降解率分别达到 71%、51% 和 56%。不加碳源处理 (对照组) 中, PCP 降解率较低 (18%) (图 1)。这一研究结果与其他研究发现相同, 可能说明 PCP 的厌氧还原脱氯过程确实是依赖初级基质的共代谢过程^[11]。外加碳源存在时, PCP 降解微生物可以部分利用所投加的基质作为其生长所需的碳源生长, 以缓解 PCP 对其的抑制; 同时易降解基质的存在, 也有利于各种微生物的迅速繁殖, 增强了微生物活性, 这样不同物种间可以以协同的作用方式促进 PCP 的脱氯降解^[12]。结果还显示, 氢气处理组的降解率也较高, 达 74% (图 1)。PCP 的厌氧脱氯是一个需要电子供体的还原过程, 氢气可作为良好的电子供体, 其还原脱氯能力在很多氯代芳烃降解实验中均得到证实^[13]。国内其他学者也发现类似的结果^[14,15]。

不过, 外加碳源的添加有一个适量的浓度范围。就拿葡萄糖的添加量来说, 外加 2 g/L 的葡萄糖对 PCP 的降解作用最显著 (图 2)。随着葡萄糖添加量由 1 g/L 增加到 2 g/L, PCP 的降解率从 55% 增加 70%。而添加葡萄糖的量超过 2 g/L 后, PCP 降解率下降。葡萄糖的添加量为 10 g/L 时, 降解率为 41%。这可能是葡萄糖浓度相对较低时 (1 g/L), 虽然能提供易降解的碳源促进微生物迅速增殖, 但不足以持续地维持厌氧体系中微生物的生长, 导致 PCP 降解有限。然而, 当葡萄糖浓度增加至 2 g/L 后, 由于碳源充足, PCP 降解菌占优势, 此时 PCP 可以达到较

高的降解率。过高的葡萄糖添加浓度 (10 g/L), 可以导致非降解 PCP 的微生物大量繁殖, 与降解 PCP 的优势菌竞争营养物质, 从而导致 PCP 的降解率下降。

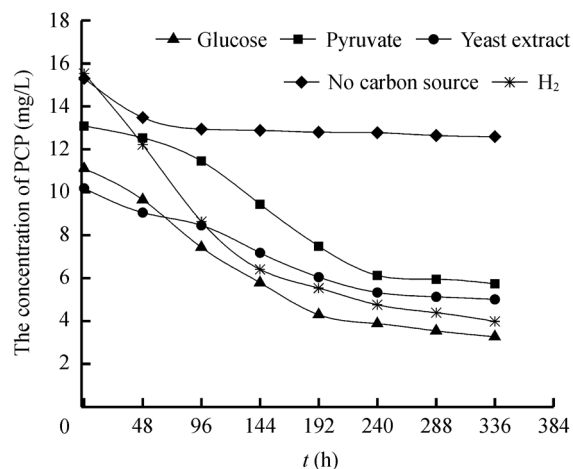


图 1 不同条件下 PCP 降解曲线

Fig. 1 Degradation curves of PCP at different conditions

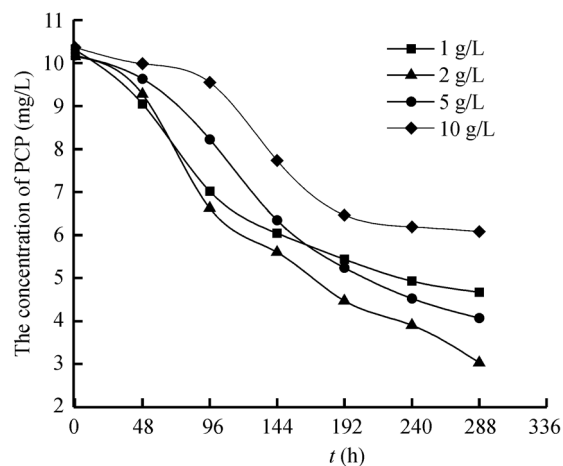


图 2 不同葡萄糖浓度下 PCP 的降解曲线

Fig. 2 Degradation curves of PCP at different glucose concentrations

2.2 基于 T-RFLP 的微生物群落分析

根据 T-RFLP 图谱中 T-RF 的数目、相对峰面积以及峰的位置, 分别计算了在外加碳源处理 (葡萄糖、丙酮酸、酵母膏)、无外加碳源和氢气处理下, PCP 降解菌群中各个 T-RF 的相对丰度 (图 3)。结果发现不同处理间污泥内部微生物群落结构基本不同。在葡萄糖处理组中, 相对丰度最高的片段为 222 bp 的 T-RF, 达 58.9%。在无碳源和酵母膏处理组中, 相对丰度较高的片段为 250 bp 的 T-RF, 分别占各自群落

的 43.7%和 63.9%。此外, 65 bp 的 T-RF 在上述两个群落中也占有较高的比例(分别为 37.8%和 22%)。丙酮酸处理组中, 65 bp 的 T-RF 群落中占有最高的比例, 为 38.6%。其次相对丰度较高的片段依次为 217 bp、222 bp 和 63 bp 的 T-RF。在氢气处理组中, 丰度较高的片段有 158 bp、240 bp、242 bp 和 437 bp 的 T-RF, 它们的相对丰度分别为 23.1%、30.5%、13.1%和 14.2%。在所有的处理组中均检测到大小为

65 bp 和 222 bp 的 T-RF (图 3)。鉴于葡萄糖和氢气处理组对 PCP 具有较高的降解率, 由此推测 222 bp、158 bp 和 240 bp 的 T-RF 代表的微生物可能是 PCP 的高效降解菌。

将获得的 T-RF 数据在网上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行检索, 确定它们可能代表的微生物种群属性。由图 4 可见, 各个处理中检测到的微生物主要是厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门

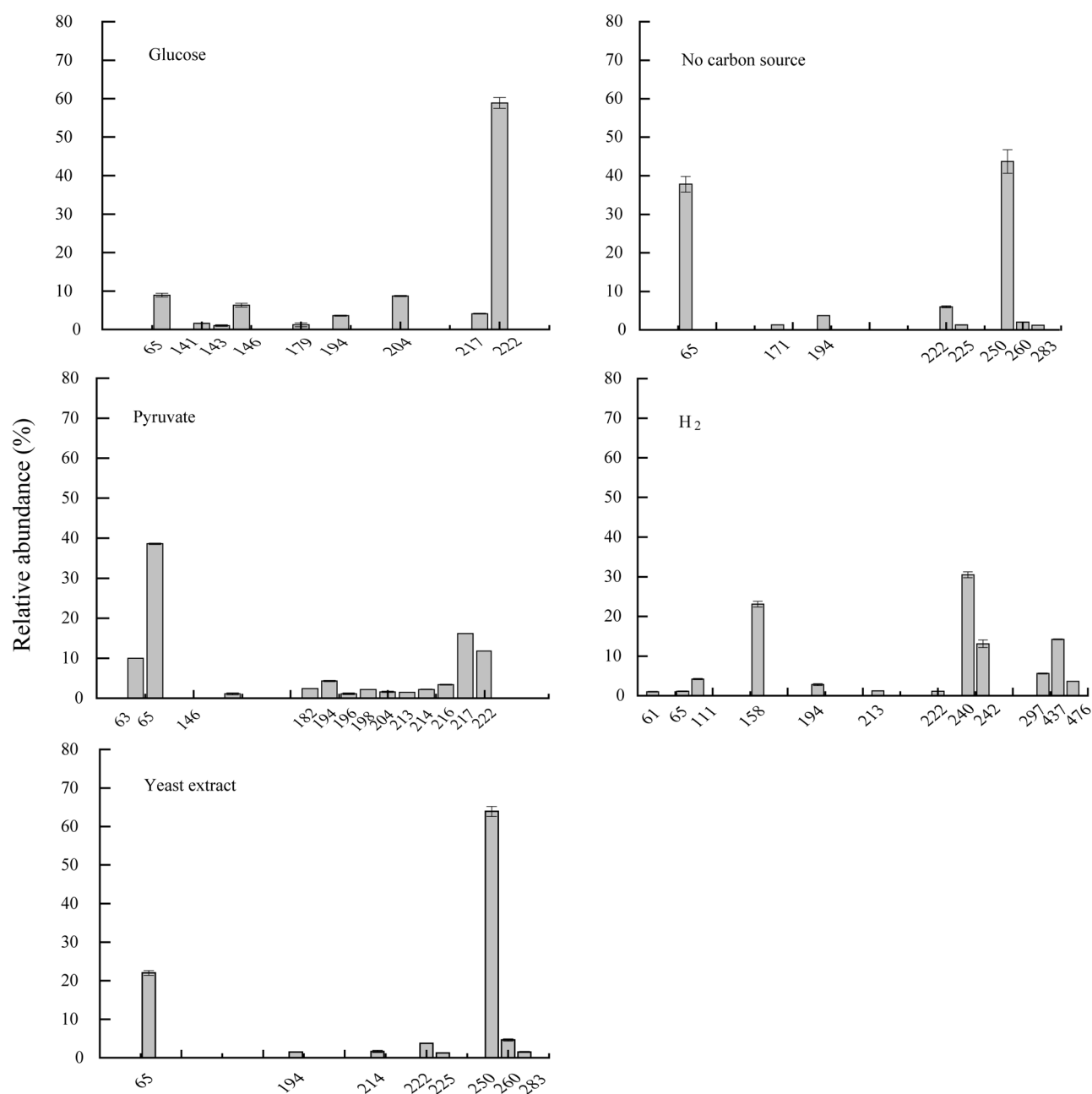


图 3 不同条件下主要 T-RF 片段的相对丰度的变化
Fig. 3 Relative abundance of T-RF at different conditions

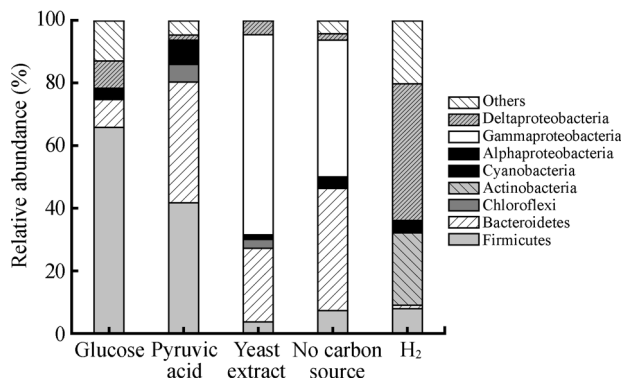


图4 不同条件下主要微生物的种群构成比

Fig. 4 Proportion of dominant microorganisms at different conditions

(Bacteroidetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria)和 δ -变形菌纲(Deltaproteobacteria)。但在不同处理下,群落中各类群所占的比例不同。葡萄糖处理条件下,占优势的微生物为 Firmicutes 门的微生物,其相对丰度为 65.8%。在丙酮酸处理组中,相对丰度较高的微生物为 Firmicutes 门和 Bacteroidetes 门的微生物,它们在群落中所占的比例分别为 41.7%和 38.6%。在酵母膏处理条件下,相对丰度较高的微生物为 Gammaproteobacteria 纲和 Bacteroidetes 门的微生物,它们在群落中所占的比例分别为 63.9%和 23.5%。在无碳源处理组中, Gammaproteobacteria 纲和 Bacteroidetes 门的微生物丰度最高,分别为 43.7%和 39%。而氢气处理条件下, Deltaproteobacteria 纲的微生物相对丰度最高,达 43.6%。其他处理组也检测到此类群的微生物,不过它们的相对丰度不高(低于 9%)。

2.3 T-RF 的定性推断

对各群落中主要的 T-RF 做了进一步推断(表 1)。推断结果显示, 65 bp 的 T-RF 可能与推断为具有溴苯酚的能力的克隆子 Phenol-4 有关^[16]。158 bp 的 T-RF 可能是 *Frankia* 属的微生物^[17]。179 bp 的 T-RF 可被推断为 *Planococcus* 属的微生物。而 217 bp、222 bp 和 297 bp 的 T-RF 则被推断为 *Clostridium* 属的微生物。此推断与其他研究结果一致。Tartakovsky 等在一驯化污泥中检测到了 *Clostridium* 和 *Planococcus* 这两个属的微生物,并推断 *Clostridium* 属的微生物很可能是 PCP 及其中间产物的还原脱氯

菌^[18]。213 bp 的 T-RF 被推测为 *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1(菌株 JW/IU-DC1 及该属的其他微生物对 PCP 具有还原脱氯的能力^[19,20])。240 bp 和 250 bp 的 T-RF 则被分别推测为与具有降解溴苯酚的作用的克隆子 2BP-6^[16]和具有降解三氯苯酚的能力的克隆子 SJA-35^[21]有关。而氢气处理组中检测到的占一定优势的两个 T-RF (437 bp 和 476 bp)在数据库中并未找到与之对应的微生物。可能有两个原因,一是 PCP 驯化污泥中还存在一些未被人们发现和鉴定的微生物,其二是用于对 T-RF 进行定性推断的威斯康星-麦迪逊大学数据库中的 16S rRNA 基因序列并不完整。

表 1 PCP 降解体系中主要 T-RF 片段所代表微生物的属

Table 1 The microorganisms represented by T-RF in the PCP-degrading consortium

片段 Fragment (bp)	可能代表的微生物 Inferred known microorganisms (clone)	系统发育位置 Phylogenetic position
65	Clone Phenol-4 (AF121885)	Bacteroidetes
158	<i>Frankia</i> 属(X53209)	Actinobacteria
179	<i>Planococcus</i> 属(X62172)	Firmicutes
213	<i>Desulfitobacterium</i> 属(L28946)	Firmicutes
217	<i>Clostridium</i> 属(L06838)	Firmicutes
222	<i>Clostridium</i> 属(L11304)	Firmicutes
240	Clone 2BP-6 (AF121888)	Deltaproteobacteria
242	Clone 2BP-6 (AF121888)	Deltaproteobacteria
250	Clone SJA-35 (AJ00946)	Chloroflexi
297	<i>Clostridium</i> 属(M60491)	Firmicutes

总之,外加葡萄糖、丙酮酸、酵母膏等碳源和补充氢气能显著促进 PCP 的降解。其中葡萄糖和氢气的添加更有利于 PCP 的降解。葡萄糖添加浓度以 2 g/L 为宜。在不同的外加碳源和氢气处理过程中,PCP 降解菌群的微生物群落结构发生了变化。PCP 降解菌群中可能存在一些已经被证实或没有被证实仅被推断为具有 PCP 脱氯活性的微生物。为了真正认识这些 PCP 降解体系中脱氯微生物的具体组成及多样性,将来有必要采用 16S rRNA 基因克隆文库方法对之进行深入研究。

参考文献

- [1] Crosby DG. Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl Chem*, 1981, 53: 1051-1080.

- [2] Tartakovsky B, Levesque MJ, Dumortier R, *et al.* Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(10): 4357–4362.
- [3] Beaudet R, Levesque MJ, Villemur R, *et al.* Anaerobic biodegradation of pentachlorophenol in a contaminated soil inoculated with a methanogenic consortium or with *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **50**(1): 135–141.
- [4] El Fantroussi S, Naveau H, Agathos SN. Anaerobic dechlorinating bacteria. *Biotech Prog*, 1998, **14**: 167–188.
- [5] Topp E, Crawford RL, Hanson RS. Influence of a readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp.. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(10): 2452–2459.
- [6] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(11): 4516–4522.
- [7] 刘 和, 李光伟, 云 娇, 等. 好氧颗粒污泥和活性污泥细菌种群结构对五氯酚污染的响应研究. *环境科学学报*, 2006, **26**(9): 1445–1450.
- [8] Shelton DR, Tiedje JM. General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **47**(4): 850–857.
- [9] Tsai YL, Olson BH. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(4): 1070–1074.
- [10] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt E and Goodfellow M eds. Wiley New York, 1991, pp. 115–175.
- [11] Hendriksen HV, Larsen S, Ahring BK. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination pentachlorophenol in granular sludge. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(1): 365–370.
- [12] Hu ZC, Korus RA, Levinson WE, *et al.* Adsorption and biodegradation of pentachlorophenol by polyurethane immobilized *Flavobacterium*. *Environ Sci Technol*, 1994, **28**(3): 491–496.
- [13] Deweerdt KA, Concannon F, Suflita JM. Relationship between hydrogen consumption, dehalogenation and the reduction of sulfur oxyanions by *Desulfomonile tiedjei*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(7): 1929–1934.
- [14] 徐向阳, 祁华宝, 王其于. 厌氧颗粒污泥还原脱氯与降解五氯酚(PCP)的研究. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, **27**(2): 145–150.
- [15] 周洪波, 陈 坚, 邱冠周, 等. 厌氧颗粒污泥对五氯苯酚脱氯过程中的影响因素. *应用与环境生物学报*, 2006, **12**(6): 846–849.
- [16] Knight VK, Kerkhof LJ, Häggblom MM. Community analyses of sulfidogenic 2-bromophenol-dehalogenating and phenol-degrading microbial consortia. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, **29**(2): 137–147.
- [17] Hahn D, Lechevalier MP, Fischer A, *et al.* Evidence for a close phylogenetic relationship between members of the genera Frankia, Geodermatophilus, and 'Blastococcus' and emendation of the family Frankiaceae. *Syst Appl Microbiol*, 1989, **11**: 236–242.
- [18] Tartakovsky B, Manuel MF, Beaumier D, *et al.* Enhanced selection of an anaerobic pentachlorophenol-degrading consortium. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **73**(6): 476–483.
- [19] Utkin I, Woese C, Wiegel J. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**(4): 612–619.
- [20] Utkin I, Dalton DD, Wiegel J. Specificity of reductive dehalogenation of substituted ortho-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **60**(1): 346–351.
- [21] von Wintzingerode F, Selent B, Hegemann W, *et al.* Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(1): 283–286.